

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 11 月 30 日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/71697 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, (72) 発明者: および
C12Q 1/66, G01N 33/50, 33/15 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小石 龍太
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03326 (KOISHI, Ryuta) [JP/JP]. 吉村 千草 (YOSHIMURA,
(22) 国際出願日: 2000 年 5 月 24 日 (24.05.2000) Chigusa) [JP/JP]. 芹澤 伸記 (SERIZAWA, Nobufusa)
(25) 国際出願の言語: 日本語 [JP/JP]; 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号
(26) 国際公開の言語: 日本語 三共株式会社内 Tokyo (JP).
(30) 優先権データ: (74) 代理人: 大野 彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710
特願平 11/143032 1999 年 5 月 24 日 (24.05.1999) JP 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株 (81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN,
式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒 KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.
103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
(JP). DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SEARCHING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 生理活性物質の探索方法

(57) Abstract: A method for searching a substance which specifically inhibits the NF- κ B activation pathway. More particularly, a method for screening a substance which specifically inhibits exclusively one of the pathway activated by stimulating cells with interleukin 1 β or tumor necrosis factor α and the pathway activated by stimulating cells with leustrodaxin compounds, among the intracellular pathways activating a promoter gene having NF- κ B-binding site. By using this method, substances useful as anti-inflammatory agents or starting materials for producing compounds useful as antiarteriosclerotics can be obtained.

(57) 要約:

本発明は、NF- κ B 活性化経路を特異的に阻害する物質の探索方法を提供するものである。

具体的には、NF- κ B 結合部位を含むプロモーター遺伝子を活性化する細胞内経路のうち、細胞をインターロイキン 1 β または腫瘍壊死因子 α で刺激した場合に活性化される経路または同じくロイストロダクシン類化合物で刺激した場合に活性化される経路のいずれか一つのみを特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法を提供する。

本発明の方法により、抗炎症剤として有用な物質、または抗動脈硬化剤として有用な化合物を作るための出発物質を得ることが可能である。

BEST AVAILABLE COPY

WO 00/71697 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

生理活性物質の探索方法

〔技術分野〕

本発明は、有用な生理活性物質の新規探索方法、特に抗炎症剤として有用な化合物の新規探索方法および抗動脈硬化剤として有用な化合物を得るための出発材料の新規探索方法に関する。

〔背景技術〕

インターロイキン 1β （以下「 $IL-1\beta$ 」という）の生物作用は多様であり、一般には生体の恒常性維持に必須な生体物質と考えられているが、その産生調節機構に異常が発生し、過剰に生産されると種々の疾患の原因となる。また、腫瘍壊死因子 α （以下「 $TNF-\alpha$ 」という）はある種の腫瘍細胞やウイルス感染細胞を死滅させたり、顆粒球の抗細菌性作用を増強させるなどの作用を有するが、やはり過剰に生産された場合には種々の疾患の原因となる。

上記二つのサイトカインは全く異なる遺伝子の産物で、その構造に類似性はなく、各々に対応した独自の受容体を有するが、それらの標的細胞、生物活性には重複する点が多い。例えば、両サイトカインは生体内に入ったエンドトキシン（LPS）によって起こる敗血症性ショックの主要原因であり（Tracey, K. J. et al. (1986) Science 234, 470-474, Tracey, K. J. et al. (1987) Nature 330, 662-664）、その他、肉芽腫（Kobayashi, K. et al. (1985) J. Immunol. 134, 358-364）、髄膜炎菌髄膜炎やマラリア感染（Curfs, J. H. A. et al. (1990) J. Exp. Med. 172, 1287-1291）等、外来性の微生物、寄生虫およびウイルス等に由来する感染症に密接に関係する。このような急性期炎症反応における主要な各段階、すなわち局所への炎症細胞の浸潤（Gamble, J. R. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 8667-8671）、発熱（Dinarello, C. A. (1987) Lymphokines, 14, 1-31）急性期蛋白の誘導（Perimutter, D. H. et al. (1986) J. Clin. Invest. 78, 1349-1354）、プロスタノイド、特にプロスタグ

ランジン E 2 (PGE 2) 産生の促進に両サイトカインは積極的な役割を担っている (Dayer, J. -M. et al. (1985) J. Exp. Med. 162, 2163-2168, Turinsky, J. et al. (1992) Am. J. Physiol. 262, E476-482, Ballou, L. R. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 20044-20050)。また、IL-1 β とTNF- α は慢性の炎症疾患、例えば慢性関節リウマチ (RA) の発症と進展に関与し、滑膜組織におけるリンパ球浸潤の活性化、滑膜細胞の増殖促進および軟骨細胞の破壊、破骨細胞の活性化による骨吸収の促進作用を示すことが知られている (Mizel, S. B. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 2474-2477, Miyasaka, N. et al. (1988) Arthritis Rheum. 31, 480-486, Arend, W. P. and Dayer, J. M. (1990) Arthritis Rheum. 33, 305-315)。

現在、慢性炎症性疾患の治療薬として使用されているグルコルチコイドは、その作用の一部が、これらサイトカインの産生抑制にあることが知られているが (Lew, W. et al. (1988) J. Immunol. 140, 1895-1902)、グルコルチコイドはその多様な生理作用により種々の重篤な副作用を誘起する不利を併せ持つ。

さらに IL-1 β とTNF- α は単球の血管内皮細胞への接着、内皮下への遊走 (Poher, J. S. et al. (1986) J. Immunol. 137, 1893-1896, Nelken, N. A. (1991) J. Clin. Invest. 88, 1121-1127)、血管平滑筋細胞の内膜での異常増殖を促進する等 (Raines, E. W. et al. (1989) Science 243, 393-396)、粥状動脈硬化の発症、進展に関与する。また、IL-1 β とTNF- α は血小板活性化因子 (PAF) の産生促進、組織因子の内皮細胞膜表面への誘導、トロンボモジュリンプロテイン C の減少、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 の産生抑制をきたし、全体として血小板凝集と血液凝固を招来して血栓形成の原因となる (Bevilacqua, M. P. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 4533-4537, Le, J. (1987) J. Lab. Invest. 56, 234-248, 佐藤靖史 (1991) 現代医療 23, 3163-3166)。

インスリン依存型糖尿病 (IDDM) では、その発症に至る過程に潜在的、慢性的、自己免疫的な炎症が膵島、特に β 細胞に起こっているが、IL-1 β や T

$\text{TNF-}\alpha$ はそれに関与する (Nerup, J. et al. (1988) Diabetes Care. 11, 16-23)。一方、インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) に際しても、 $\text{TNF-}\alpha$ は脂肪細胞での産生を介して、筋肉、肝細胞に作用し、インスリン抵抗性を発揮することに関与する (Spiegelman, B. M. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6823-6826)。糸球体腎炎発症の主体をなすメサンギウム細胞の増殖と基質の増生に $\text{IL-1}\beta$ と $\text{TNF-}\alpha$ は深く関与する (Werber, H. I. et al. (1987) J. Immunol. 138, 3207-3212, Baud, L. et al. (1992) Kidney Int. 41, 600-603)。

$\text{IL-1}\beta$ や $\text{TNF-}\alpha$ は T 細胞からのインターロイキン 2 (IL-2) 産生やその分泌、その受容体発現を促し、また、その他の免疫細胞に作用してその働きを高めることで免疫能を賦活化する (Gillis, S. and Mizel, S. B. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 1133-1137, Scheurich, P. et al. (1987) J. Immunol. 138, 1786-1790)。この作用により、両サイトカインは、例えば、移植の際に生じる移植片対宿主病 (GVHD) 発症の一因となる。

$\text{TNF-}\alpha$ は、慢性の感染症やガン患者において脂肪細胞のリポプロテインリパーゼ活性を抑制して食欲不振を引き起こすことにより、極度の体重減少、消耗を引き起こし (cachexia)、そのため $\text{TNF-}\alpha$ はカケクチン (cachectin) と呼ばれている (Beutler, B. et al. (1985) Nature 316, 552-554)。 $\text{TNF-}\alpha$ はヒト免疫不全ウイルス (以下「HIV」という) 感染細胞において、染色体内に挿入された HIV のウイルスゲノム末端 (LTR) からの転写を転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ を介して活性化させ、HIV の増殖を亢進させる (Nabel, G. et al. (1987) Nature 326, 711-713, Schreck, R. et al. (1991) EMBO J. 10, 2247-2258)。

その他、 $\text{IL-1}\beta$ や $\text{TNF-}\alpha$ の過剰生産に基づく疾患として、劇症肝炎 (Muto, Y. et al. (1988) Lancet II 72-74)、喘息、突発性肺繊維症 (Kelley, J. (1990) Am. Rev. Respir. Dis. 141(3), 765-788)、ARDS (adult respiratory distress syndrome) (Millar, A. et al. (1989) Lancet II 712-

714) 等の呼吸器系疾患、自己免疫性甲状腺疾患 (江口勝美ら 最新医学からのアプローチ1「サイトカイン」 メジカルビュー社 (1991) 38-47)、ライム病 (Habicht, G. S. et al. (1985) J. Immunol. 134, 3147-3154)、アルツハイマー病 (Griffin, W. S. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 7611-7615)、クローン病 (八木田旭邦 医学のあゆみ (1988) 147, 375-379)、中毒ショック症候群 (Ikejima, T. et al. (1984) J. Clin. Invest. 73, 1312-1320)、骨粗しょう症 (Pacifichi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 2398-2402)、痛風 (Di Giovine, F. S. et al. (1987) J. Immunol. 138, 3213-3218)、急性骨髄性白血病 (Sakai, K. et al. (1987) J. Exp. Med. 166, 1597-1602)、子宮内膜炎 (Romero, R. et al. (1989) Am. J. Obstet. Gynecol. 160, 1117-1123) などが挙げられる。

スフィンゴミエリナーゼ (以下「SMase」という) は、生体内の細胞膜系および核内に含まれるコリン含有脂質の一つであるスフィンゴミエリン (以下「SM」という) を基質として、このものをセラミドとホスホリルコリンに分解する酵素である。本酵素は、当初は酸性域に至適 pH を有するリソソームの加水分解酵素の一つとして見出された (酸性 SMase、以下「A-SMase」という) が、中性域に至適 pH を有する同酵素 (中性 SMase、以下「N-SMase」という) 活性が、ミクロソーム画分や形質膜にも見出されており (Allan, D. et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 693, 53-67, T-Koizumi, K. and Kojima, K. (1986) J. Biochem. 99, 1803-1806)、これらの諸酵素が生体内の SM の代謝に実際に関与しているものと考えられる。上記反応の生成物の一つであるセラミドは、さらにセラミダーゼにより加水分解され、脂肪酸とスフィンゴシンを生じる。そして SM が哺乳動物体内で代謝されて、セラミドさらにスフィンゴシンとなることは、*in vivo* の実験で確かめられている (Schneider, P. B. and Kennedy, E. P. (1968) J. Lipid Res. 9, 58-64)。SM の分解産物であるこのセラミドやスフィンゴシンは、細胞の増殖、分化およびそれらに密接に関連を持つ情報伝達の制御機構に関与していることが示され (小島清秀と小泉恵子 蛋白質 核酸 酵素 (1991) 36, 629-637)、この反応経路は SM 経路と呼ばれている。IL-1 β や TNF- α が標的細胞の受容体に結合し、その後、細胞

内にシグナルが伝達されるときに、このSM経路が関与することが示されている (Dressler, K. A. et al. (1992) Science 255, 1715-1718, Mathias, S. et al. (1993) Science 259, 519-522)。すなわち、IL-1 β やTNF- α により細胞内でSMaseが活性化され、SMの加水分解がおこりセラミドが生じ、このセラミドがセカンドメッセンジャーとして機能することで転写因子NF- κ Bを活性化する (Wiegmann, K. et al. (1994) Cell, 78, 1005-1015, Schutze, R. et al. (1992) Cell 71, 765-776)。転写因子NF- κ BはIL-1 β やTNF- α それ自身の遺伝子の転写活性を促進するのみならず、IL-6、IL-8、IL-2などの炎症性サイトカインや炎症反応に関わる接着蛋白の遺伝子の活性化に重要な役割を果たしていることが知られ、炎症反応の制御に中心的な役割を果たしていると考えられている (Yamamoto, K. (1996) Molecular Medicine 33, 990-998)。したがって、IL-1 β やTNF- α によるNF- κ Bの活性化を特異的に阻害する物質は抗HIV剤、抗糖尿病剤、抗動脈硬化剤、抗骨粗鬆症剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、利尿剤、そして呼吸器系疾患、甲状腺疾患、アルツハイマー病、肝炎、腎炎、白血病およびカケクシアに対する予防薬、治療薬として使用できる。しかしながら、NF- κ Bのサブユニットであるp52 (NF- κ B2) およびp50 (NF- κ B1) のダブルノックアウトマウスを作製すると大理石病が発症するという報告 (Iotsova, V. et al. (1997) Nature Med. 3, 1285-1289) や、NF- κ B1のノックアウトマウスではB細胞の機能に異常が生じるという報告 (Sha, W. C. et al. (1995) Cell 80, 321-330, Snapper, C. M. et al. (1996) J. Immunol. 156, 183-191)、NF- κ Bのサブユニットの一つであるRel Aのノックアウトマウスは胎生致死であり、肝組織に変性がみられるという報告 (Beg, A. A. et al. (1995) Nature 376, 167-170)、さらにRel B、あるいはc-Relのノックアウトマウスには、免疫系の異常が見出されるという報告 (Burkly, L. et al. (1995) Nature 373, 531-536, Weih, F. et al. (1995) Cell 80, 331-340, Kontgen, F. et al. (1995) Genes Dev. 9, 1965-1977) がなされており、NF- κ Bそのものの活性化を完全に阻害することは重篤な副作用を生じる可能性が高い。一方、A-SMaseを遺伝的に欠損する疾患としてNiemen-Pick病が知られていることから (垂井清一郎と多田啓也、遺伝病マニュアル (上) 中山書店 (1995) 128-129)、

IL-1 β やTNF- α によるNF- κ Bの活性化経路（SM経路）のうちA-SMaseを介した経路を遮断することにより、やはり重篤な副作用が生じる可能性が考えられる。

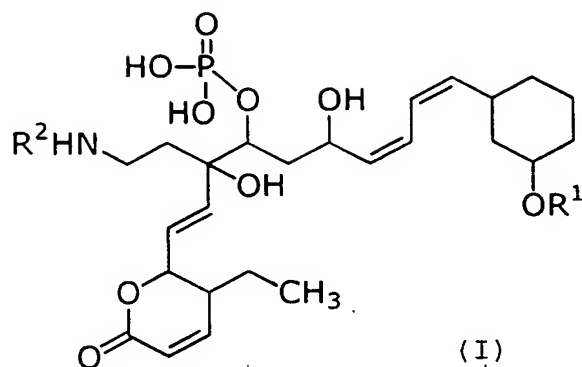
上記の知見より、抗炎症剤であって、より副作用の低いNF- κ B活性化阻害剤としては、SM経路のうちA-SMaseを介したNF- κ B活性化経路は阻害せず、それ以外のNF- κ B活性化経路を特異的に阻害することが望ましい。

一方、A-SMase特異的阻害剤は細胞内で作用して既に述べたような副作用を起こす可能性が高いため、そのままでは医薬としての利用可能性は低いと考えられるが、この物質に種々の修飾を施すことにより、細胞膜を通過せず分泌型A-SMaseを特異的に阻害する抗動脈硬化剤（Schissel, S. L. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 2738-2746、Marathe, S. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 4081-4088、Schissel, S. L. et al. (1996) J. Clin. Invest. 98, 1455-1464、Auge, N. et al. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19251-19255、Tabas, I. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 20419-20432 および Kinscherf, R. et al. (1997) FEBS Lett. 405, 55-59）を開発することが可能となる。

しかしながら、そのような、A-SMaseを介したNF- κ B活性化経路またはA-SMaseを介さないNF- κ B活性化経路のいずれかを特異的に阻害する物質の探索方法は知られておらず、その開発が望まれていた。

[発明の開示]

本発明は、NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子を活性化する細胞内経路のうち、細胞をインターロイキン1 β または腫瘍壊死因子 α で刺激した場合に活性化される経路または同じく下記一般式（I）で表される化合物：



(式中、 R^1 は5-メチルヘキサノイル基、6-メチルオクタノイル基、7-メチルオクタノイル基または水素原子を表し、 R^2 は水素原子または $CO R^3$ で表される基を表し、 R^3 は水素原子または下記B群から選択される置換基を有していてもよいA群から選択される基を表す。ただし、 R^1 または R^2 の少なくとも一つは水素原子である；

〔A群〕 アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アリールアルキル基、アリールアルケニル基、アリールアルキニル基、アルキルオキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、アリールアルケニルオキシ基、アリールアルキニルオキシ基、アルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、アリールアルキルアミノ基；

〔B群〕 ハロゲン基、ヒドロキシ基、低級アルコキシ基、低級脂肪族アシルオキシ基、カルバモイル基、カルバモイルオキシ基、低級脂肪族アシル基、ニトロ基、低級脂肪族アシルアミノ基、低級アルコキシカルボニル基、シアノ基、アリールオキシ基) またはその塩で刺激した場合に活性化される経路のいずれか一つのみを特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法であって、

(i) 予めNF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にあり、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子（以下「マーカー遺伝子」という）で形質転換された培養細胞を、インターロイキン1 β または腫瘍壊死因子 α の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作；および、

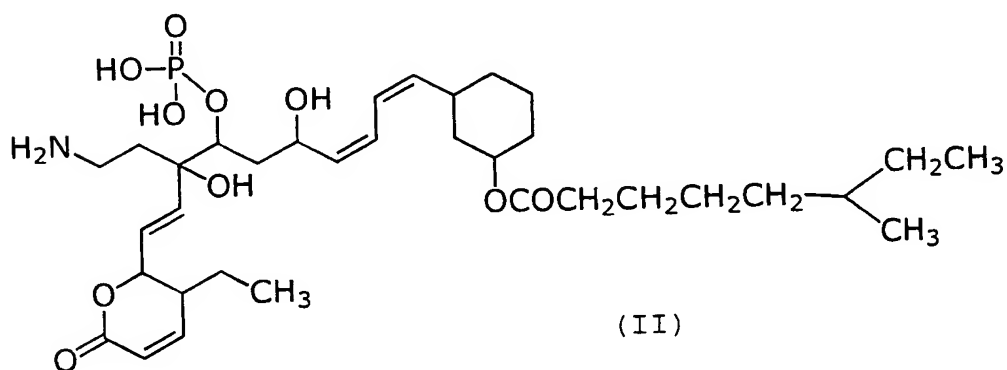
(j i) 上記 (i) 記載の培養細胞を上記一般式 (I) で表される化合物また

はその塩の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作を行なって、(i) または (i i) のいずれか一つの検出操作においてのみマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択することを特徴とする方法に関する。

ここに、一般式 (I) 記載の化合物は、好ましくは、 R^1 が 6-メチルオクタノイル基であり、 R^2 が水素原子であるものである。

また、上記「(i) または (i i) のいずれか一つの検出操作においてのみマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択することを特徴とする方法」とは、(i) においてマーカー遺伝子の発現を抑制し、(i i) においてマーカー遺伝子の発現を抑制しない被検物質を選択するか、または (i) においてマーカー遺伝子の発現を抑制せず、(i i) においてマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択するものである。

本発明者らは、下記式 (II) で表される化合物ロイストロダクシン B :



(特開平 5-123179 号公報および Kohama, T. et al. (1993) J. Antibiotics 46, 1503-1511 参照) の作用機序を検討する過程で、ヒト骨髄間質細胞株 KM-102 において、ロイストロダクシン B が A-SMase を介した経路で NF- κ B を活性化すること、および IL-1 β と TNF- α は A-SMase 以外の経路で NF- κ B を活性化することを見出した。KM-102 細胞、

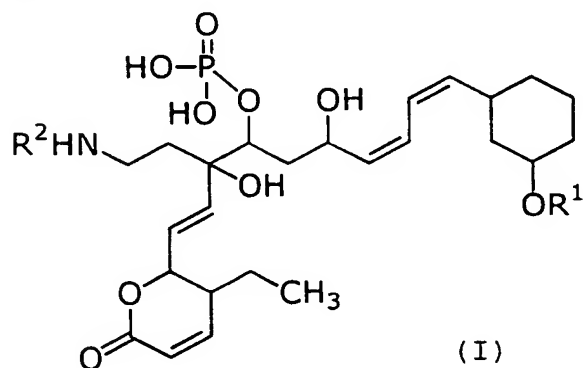
ロイストロダクシンBおよびIL-1 β あるいはTNF- α を用いることで、先述したようなSM経路のうちA-SMaseを介したNF- κ B活性化経路は阻害せず、それ以外のNF- κ B活性化経路を特異的に阻害するNF- κ B活性化阻害剤をスクリーニングすることが可能であることから、転写因子AP-1結合部位に変異を導入したヒトIL-8プロモーターにルシフェラーゼを連結したレポーター遺伝子をKM-102細胞に導入し、安定的に保持している株を選択した後、この細胞株を用いてロイストロダクシンBによるレポーター遺伝子の活性化は阻害しないが、IL-1 β あるいはTNF- α によるレポーター遺伝子の活性化を阻害する物質を得ることができる系を構築した。

本発明の方法は、NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下であり、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子（以下「マーカー遺伝子」という）で予め形質転換された動物細胞を、

(i) IL-1 β またはTNF- α を添加した培地で培養した群；および

(ii) ロイストロダクシン類化合物を添加した培地で培養した群

に分け、それぞれの群における該マーカー遺伝子の発現量を比較する実験系において、上記培養時に被検試料を添加することにより上記各群の該マーカー遺伝子の発現量に差異が現れるか否かを調べることにより実施することができる。ここに、「ロイストロダクシン類化合物」とは、下記一般式(I)で表される化合物：



(式中、R¹は5-メチルヘキサノイル基、6-メチルオクタノイル基、7-メチルオクタノイル基または水素原子を表し、R²は水素原子またはCOR³で表

される基を表し、 R^3 は水素原子または下記B群から選択される置換基を有していてもよいA群から選択される基を表す。ただし、 R^1 または R^2 の少なくとも一つは水素原子である：

[A群] アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アリールアルキル基、アリールアルケニル基、アリールアルキニル基、アルキルオキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、アリールアルケニルオキシ基、アリールアルキニルオキシ基、アルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、アリールアルキルアミノ基；

[B群] ハロゲン基、ヒドロキシ基、低級アルコキシ基、低級脂肪族アシルオキシ基、カルバモイル基、カルバモイルオキシ基、低級脂肪族アシル基、ニトロ基、低級脂肪族アシルアミノ基、低級アルコキシカルボニル基、シアノ基、アリールオキシ基) またはその塩をいう（特開平5-123179号、特開平7-2886号および特開平8-41087号公報参照）。これらのうち、本発明において最も好ましく使用されるのは、上記一般式(I)において R^1 が6-メチルオクタノイル基であり、 R^2 が水素原子であるロイストロダクシンB、すなわち上記式(II)で表される化合物である。

上記形質転換動物細胞は、IL-1 β 、TNF- α またはロイストロダクシン類化合物を添加した培地で培養した場合に、該マーカー遺伝子の発現量が亢進するものでなければならない。このような系において、該マーカー遺伝子の発現を(i)群においてのみ抑制し、(ii)群においては抑制しないような試料（ただしIL-1 β またはTNF- α のうち培地に添加された方と相互作用しないもの）は、抗炎症剤として有用な物質であると考えられる。逆に、該マーカー遺伝子の発現を(i)群においては抑制せず、(ii)群においてのみ抑制するような試料（ただしロイストロダクシン類化合物自体と相互作用しないもの）は、A-SMase特異的阻害剤であると考えられる。このA-SMase特異的阻害剤は細胞内で作用して既に述べたような副作用を起こす可能性が高いが、この物質に種々の修飾を施すことにより、細胞膜を通過せず分泌型A-SMaseを特異的に阻害する、抗動脈硬化剤を開発することが可能となる。したがって、本発

明の方法は抗動脈硬化剤として有用な化合物を得るための出発物質のアッセイ方法としても有用である。

本発明の方法において、予めNF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にあるマーカー遺伝子で形質転換される動物宿主細胞は、該細胞へのIL-1 β またはTNF- α 刺激がA-SMaseを介さずに伝達される細胞株であればよい。そのような細胞として、HL-60（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（以下「ATCC」という）No. CCL240）（Yang, Z. et al. (1993) J. Biol. Chem 268, 20520-20523）、EL4（ATCC No. TIB39）（Mathias, S. et al. (1993) Science 259, 519-522）、KM-102（Harigaya, K. and Handa, H. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3447-3480）等を挙げることができるが、これらに限定されない。

マーカー遺伝子の転写を開始させるためのプロモーターは、転写因子NF- κ Bの結合配列を含み、他の転写因子結合部位を実質的に含まないものであればよく、好適には、AP-1結合部位に変異を導入したヒトIL-8のプロモーター配列（例えば配列表の配列番号1）であるが、これに限定されない。

上記プロモーター下流に連結されるマーカー遺伝子にコードされるマーカータンパク質は、宿主である上記細胞が本発明の方法の一連の過程において産生し得る他のいかなるタンパク質とも特異的に区別可能なもの（好ましくは、形質転換前の上記細胞が該マーカータンパク質と同一または類似のタンパク質をコードする遺伝子を持たないようなもの）であればよい。例えば、マーカータンパク質が該細胞に対して毒性を有するようなものや、該細胞が感受性を有する抗生物質の耐性を付与するものであるような場合でも、マーカー遺伝子の発現の有無は細胞の生存率で判定することが可能である。しかしながら、本発明で用いられるマーカー遺伝子としてより好ましいものは、発現量を特異的かつ定量的に検出することができる（例えば該マーカー遺伝子にコードされるタンパク質に対する特異的抗体が取得されているような）構造遺伝子である。さらに好ましくは、いわゆるレポーター遺伝子、すなわち外来の基質と特異的に反応することにより定量的測

定が容易な代謝産物を生じるような酵素等をコードする遺伝子である。そのようなものとして、以下に挙げるようなタンパク質をコードする遺伝子を例示することができるが、本発明はそれらに限定されない：

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ：クロラムフェニコールにアセチル基を付加する。いわゆるCATアッセイ等で検出可能。プロモーターを組み込むだけでレポーターアッセイ用のベクターを調製できるベクターとしてpCAT3-Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている；

ホタルルシフェラーゼ：ルシフェリンを代謝した際に生じる生物発光を測定することにより定量する。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpGL2-Basicベクター（プロメガ社製）が市販されている；

β -ガラクトシダーゼ：呈色反応、蛍光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしてp β gal-Basic（プロメガ社製）が市販されている；

分泌型アルカリホスファターゼ：呈色反応、生物発光または化学発光でそれぞれ測定可能な基質がある。レポーターアッセイ用のベクターとしてpSEAP2-Basic（クロンテック社製）が市販されている；

緑色蛍光タンパク質（green-fluorescent protein）：酵素ではないが、自らが蛍光を発するので直接定量できる。同じくレポーターアッセイ用のベクターとしてpEGFP-1（クロンテック社製）が市販されている。

上記プロモーター下流にマーカー遺伝子が連結されたものを調製した後、上記宿主細胞をトランスフェクションすることにより本発明の方法に用いるための形質転換細胞を得る。この形質転換細胞の作出においては、導入される遺伝子は、宿主細胞の染色体に組み込まれるなどして、宿主細胞の継代を重ねても安定的に

保持されることが望ましいので、そのように形質転換された細胞を選択する目的で、導入遺伝子に抗生物質耐性等の選択マーカー（例えば、ネオマイシン（またはG 4 1 8）耐性遺伝子neo等）が連結されたものをトランスフェクションに用いるか、もしくは別個に調製した該選択マーカーと導入遺伝子とをコ・トランスフェクションすることが好ましい。その後は該選択マーカーの特性を利用することにより、安定的に形質転換された細胞を選択する。

培養細胞株を形質転換する方法としては、DEAEーデキストラン法（Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308）、リン酸カルシウムーDNA共沈殿法（Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457）、電気パルス穿孔法（Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845）等を挙げることができるが、これらに限定されず、本発明の属する技術分野において汎用される他の方法も採用することができる。ただし、培養細胞株がいわゆる浮遊細胞である場合は、リン酸カルシウムーDNA共沈殿法以外の方法を用いることが好ましい。

このようにして形質転換操作を行った細胞に目的の遺伝子が導入されたか否かは、選択マーカーの発現を指標として選択された細胞を、IL-1 β 、TNF- α またはロイストロダクシン類化合物を添加した培地で培養したときの、目的のマーカー遺伝子の発現を調べることによって確認することができる。

このようにして得られた形質転換細胞は、IL-1 β 、TNF- α またはロイストロダクシン類化合物を添加しない培地で培養しているときはマーカー遺伝子を発現せず、IL-1 β 、TNF- α またはロイストロダクシン類化合物（以下これらを総称して「マーカー遺伝子発現誘発物質」という）を添加した培地中で培養するとマーカー遺伝子を発現する。培地中に添加するそれぞれのマーカー遺伝子発現誘発物質の量は、IL-1 β およびTNF- α については、好ましくは終濃度として1乃至10 ng/ml、最も好ましくは10 ng/mlであり、ロイストロダクシン類化合物については、好ましくは終濃度として50乃至80 ng/ml、最も好

ましくは 50 ng/ml であるが、これらに限定されず、マーカー遺伝子の発現を有意に上昇させ、かつ細胞に対する毒性を表さない濃度であればよい。

これらマーカー遺伝子発現誘発物質を添加した培地中で、上記形質転換細胞をマーカー遺伝子の発現が可能な条件下で培養するにあたって、さらに培地中に任意の被検物質を添加した条件および添加しない条件を設定して、一定時間培養後、マーカー遺伝子の発現量を測定し、被検物質の添加によりマーカー遺伝子の発現量に変化が生じるか否かを検定する。「マーカー遺伝子の発現が可能な条件」は、細胞が生存して、蛋白質の生産が可能な条件であればよいが、好ましくは、使用される細胞株に適合した培地（ウシ胎児血清等の血清成分を添加してもよい）を使用し、4乃至6%（最も好適には5%）の炭酸ガスを含む空気存在下、36乃至38℃（最も好適には37℃）で8乃至16時間（最も好適には16時間）培養する。

このような系において、同一濃度で、IL-1 β またはTNF- α 添加群においてのみマーカー遺伝子の発現を80%以上抑制し、ロイストロダクシン類化合物添加群においては10%以上抑制しないような被検物質（ただしIL-1 β またはTNF- α のうち培地に添加された方と相互作用しないもの）は、抗炎症剤として有用な候補物質として選択される。

逆に、同一濃度で、IL-1 β またはTNF- α 添加群においてはマーカー遺伝子の発現を10%以上抑制せず、ロイストロダクシン類化合物添加群においてのみ80%以上抑制するような被検試料（ただしロイストロダクシン類化合物自体と相互作用しないもの）は、分泌型A-SMa s e 特異的阻害剤、すなわち抗動脈硬化剤として有用な化合物を得るための出発物質として選択される。

[図面の簡単な説明]

図1は、ヒトIL-8遺伝子5'上流配列またはその変異体と連結したルシフェラーゼ遺伝子を含むDNAの構築図である。

図2は、w t I L - 8でトランスフェクションした細胞に対する、ロイストロダクシンBおよびN A Cの効果を示す図である。

図3は、m N F - κ Bでトランスフェクションした細胞に対する、ロイストロダクシンB、T N F - α およびI L - 1 β の効果を示す図である。

図4は、ゲルシフトアッセイの結果を示した図である。

図5は、m A P - 1でトランスフェクションした細胞に対する、ロイストロダクシンB、デシプラミンおよびマレイン酸パーヘキシリンの効果を示した図である。

図6は、デシプラミン、マレイン酸パーヘキシリンのT N F - α 、I L - 1 β 刺激に対する効果を示す図である。

図7は、D 6 0 9のロイストロダクシンBに対する効果を示す図である。

図8は、D 6 0 9のT N F - α 、I L - 1 β に対する効果を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

以下に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1. ヒトI L - 8遺伝子5' 上流プロモーター領域の単離とレポータープラスミドの作製

ヒト肺由来線維芽細胞株V A - 1 3 (理研細胞バンクR C B 2 5 1) より培養細胞DNA精製キット (セル・カルチャー・DNAキット、キアゲン社製) を用いてゲノムDNAを単離した。文献 (Nakamura, H. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 19611-19617, Mukaida, N. et al. (1989) J. Immunol. 143, 1366-1371) に基づき、ヒトI L - 8遺伝子の5' 末端側上流配列を得るために、下記の配列のオリゴヌクレオチド:

5' - atgtctcgag aattcagtaa cccaggcatt attttatc -3'

(配列表の配列番号2) ; および

5' - ttgtcctaga agcttgtgtg ctctgctgtc -3'

(配列表の配列番号3)

を自動DNA合成機（（株）パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ社製モデル394）を使用してホスホアミダイト法（Matteucci, M. D., and Caruthers, M. H. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191）で合成し、精製した。

これらの合成DNAをプライマーとし、上記ヒトゲノムDNA 1 μ gを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施した。すなわち、プライマーをそれぞれ終濃度1 μ M、10倍のTaqポリメラーゼ反応用緩衝液（（株）パーキンエルマー・ジャパン社製Taqポリメラーゼ（AmpliTaq）に添付）を反応液の1/10量、またTaqポリメラーゼ（AmpliTaq、（株）パーキンエルマー・ジャパン社製）を2.5単位加えてPCRを行った。PCRは94℃で1分30秒、55℃で1分、72℃で1分の温度サイクルを20回繰返した後、さらに72℃で7分間保温した。

PCR後、増幅されたDNA産物10 μ lを制限酵素XhoIおよびHindIIIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、増幅断片に相当するDNAバンド部分のゲルを切り出し、DNA回収試薬（ジーンクリーン：フナコシ（株）社）を用いてDNAをゲルより回収した。このDNA断片をルシフェラーゼをコードするDNAが予め挿入されたプラスミドpGL-2-Promoterベクター（プロメガ社製）を制限酵素XhoIおよびHindIIIで消化したものと連結した後、大腸菌JM-109（東洋紡（株）社製）を形質転換した。目的のDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを有する形質転換体よりプラスミドDNAを回収して制限酵素DraIおよびHindIIIで消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動後、約200bpに相当するバンド部分のゲルを切り出し、上記と同様にしてDNA断片をゲルより回収した。その後、このDNA断片を制限酵素SmaIおよびHindIIIで消化したプラスミドpGL-2-Promoterベクターと連結し、大腸菌JM-109を形質転換した。得られたレポータープラスミドに挿入されたDNA（以下「wtIL-8」という）のヌクレオチド配列の解析を行い、既に報告されているヒトIL-8遺伝子の5'末端側上流領域（配列表の配列番号4）と一致することを確認した。

次に、このw t I L-8を用いて、ヒトI L-8プロモーター領域のA P-1結合部位（転写開始点から数えて-126から-120のヌクレオチド5'-tgactca-3'：配列表の配列番号4のヌクレオチド番号62から68）またはN F- κ B結合部位（転写開始点から数えて-80から-70のヌクレオチド5'-ggaatttcctc-3'：配列表の配列番号4のヌクレオチド番号108から118）に点変異を導入した。

まずA P-1部位に変異を導入するために、下記の配列を有するオリゴヌクレオチド：

5'- ggaagtgtga tatctcaggt ttgccc -3' （配列表の配列番号5）

を合成し、精製した。この合成オリゴヌクレオチドを用いてw t I L-8 DNAを鋳型とし、U. S. E. ミュータジェネシス・キット（アマシャム・ファルマシア社製）を用いてw t I L-8のA P-1部位に点変異を導入したDNA（m A P-1：配列表の配列番号1）を調製した。

また、N F- κ B部位に点変異を導入するために、下記の配列を有するオリゴヌクレオチド：

5'- gggccatcag ttgcaaatcg ttcactttcc tctgac -3' （配列表の配列番号6）

を合成し、精製した。この合成オリゴヌクレオチドを用いてw t I L-8 DNAを鋳型とし、U. S. E. ミュータジェネシス・キットを用いてw t I L-8のN F- κ B部位に点変異を導入したDNA（m N F- κ B：配列表の配列番号7）を調製した。

このようにして得られた、w t I L-8 DNAまたはその変異体がルシフェラーゼをコードするDNAの5'末端側に挿入されたプラスミドDNA（図1）をそれぞれ塩化セシウム法で精製し、以下のトランスフェクション実験に用いた。

参考例 2. トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

ロイストログクシンBの作用機序を調べるために、下記の方法に従って参考例1

で調製したレポータープラスミドDNAをKM-102細胞へ導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。

1) トランスフェクション

まずKM-102細胞を5%ウシ胎児血清（以下「FBS」という。モアゲート社製）を含有するイスコフ修正ダルベッコ培地（以下「IMDM」という。ライフテクノロジー社製）（以下、単に「培地」という）で、細胞培養フラスコ（150 cm²、コーニング社製）中で37℃、5% CO₂下にて培養を行って、セミコンフルエントになるまで増殖させた後、トリプシン-エチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）溶液（シグマ社製）処理（室温で5分）を行ってから、細胞をフラスコより回収した。この細胞を6穴の細胞培養用プレート（ファルコン社製）へ2×10⁵細胞/ウェルで入れ、一晚培養してから培地を新鮮なものと交換した。トランスフェクションはトランスフェクション試薬キット（セルフェクト・キット、アマシャム・ファルマシアバイオテクノロジー社製）を用いて行った。すなわち、参考例1で調製されたプラスミドDNA 各5 μgをエタノール沈殿し、それぞれ滅菌水120 μlに溶解したものに、トランスフェクション試薬キット添付のA緩衝液を120 μl添加し室温で10分間放置した。このものにキット添付のB緩衝液を240 μl加えて室温で15分間放置した後、この溶液を240 μl/ウェルでKM-102細胞に添加して16時間培養した。培養後、2 ml/ウェルの培地で細胞を2回洗ってから、新しい培地を加えて3時間培養した。この細胞にメタノールで調製したロイストロダクシンB（特開平5-123179号公報参照）溶液を終濃度50 ng/mlで加えるか、または無添加で培養し、16時間後に細胞溶解剤（東洋インキ製造（株）社製）を200 μl/ウェル加えて細胞を溶解した。

2) ルシフェラーゼ活性の測定

96穴測定用プレート（マイクロライト1、ダイナテック社製）に上記1)で調製された細胞溶解液を20 μl/ウェル入れ、発光試薬キット（ピッカジーン発光キット、東洋インキ製造（株）社製）で調製した発光基質液100 μl/ウェルを加えてから、各ウェルの発光量を発光プレートリーダー（ルミナスCT-

9000D、ダイアヤトロン社製)で1ウェルあたり5秒間測定した。

測定の結果、wtIL-8でトランスフェクションした細胞ではロイストロダクシンBはルシフェラーゼ活性を約33倍増大させることが明らかになった(図2参照。なお、図中において「LSN-B」とはロイストロダクシンBを表す。以下において同じ)。また、mAP-1でトランスフェクションした細胞でもロイストロダクシンBによるルシフェラーゼ活性の増大が検出された(約25乃至40倍)(図5)が、mNF- κ Bでトランスフェクションした細胞ではロイストロダクシンBによるルシフェラーゼ活性の増大はみられなかった(図3)。

ロイストロダクシンBの作用機序をさらに詳しく解析するために、NF- κ Bの阻害剤として知られているN-アセチル-L-システイン(Schreck, R. et al. (1991) EMBO J. 10, 2247-2258、Meyer, M. et al. (1993) EMBO J. 12, 2005-2015 および Mihm, S. et al. (1991) AIDS 5, 497-503 参照。以下「NAC」という)を用いて同様の実験を行った。まず上記1)記載の方法でwtIL-8 DNAでKM-102細胞をトランスフェクションした後、2mlの培地で各ウェルを2回洗ってから新しい培地に置き換えた。3時間培養後、滅菌水で調製した1M濃度のNAC(シグマ社製)を終濃度10mMで添加しさらに3時間培養後、終濃度50ng/mlでロイストロダクシンBを添加し、以下上記と同様にしてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、10mMのNAC添加によりロイストロダクシンBのルシフェラーゼ活性増強効果が強く抑制された(図3)。

参考例3. ゲルシフトアッセイ

上記参考例2よりロイストロダクシンBの作用点はNF- κ Bであることが予想されたが、他の転写因子を活性化している可能性も考えられる。そこでこの可能性を調べる目的で、下記の方法に従ってゲルシフトアッセイを実施した。

1) DNAプローブ

ゲルシフトアッセイに用いたDNAプローブ(CTF(CAAAT-box binding

transcription factor)、A P - 1 (activator protein-1)、C R E B (cAMP responsive element binding protein)、N F - κ B (nuclear factor- κ B)、S P - 1 (specificity protein-1)、O C T - 1 (octamer binding protein-1)、T F I I D (transcription factor II-D)、G R E (glucocorticoid responsive element binding protein) および A P - 2 (activator protein-2) 用) はプロメガ社より購入した他、下記の2種類の合成オリゴヌクレオチド:

5' - aggacgtcac attgcacaat cttaataagg -3'

(配列表の配列番号8) ; および

5' - ccttattaag attgtgcaat gtgacgtcct -3'

(配列表の配列番号9)

を合成し、両ヌクレオチドをアニーリングさせたものを N F - I L - 6 (nuclear factor IL-6) 結合配列を含むプローブとして使用した。

2) 核蛋白質抽出物の調製

K M - 1 0 2 細胞を細胞培養用シャーレ (ϕ 1 0 0 mm、コーニング社製) 中でセミコンフルエントになるまで 3 7 °C、5 % C O ₂ 存在下で培養してから、終濃度 5 0 n g / m l でロイストロダクシン B を添加、あるいは無添加で 4 8 時間培養後、文献記載の方法 (Andrew, N. C. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 2499) に従って核蛋白質抽出物を回収した。すなわち、細胞をトリプシン - E D T A 処理を行なってから回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (以下「P B S」という。宝酒造社製) 1 m l で洗浄した。遠心して P B S を除いた後、4 0 0 μ l の A 緩衝液 (1 0 m M N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N' - 2 - ヒドロキシプロパン - 3 - スルホン酸 (以下「H E P E S」という) - 水酸化カリウム (4 °C で p H 7 . 9)、1 . 5 m M 塩化マグネシウム、1 0 m M 塩化カリウム、0 . 5 m M ジチオスレイトール、0 . 2 m M 弗化フェニルメチルスルホニル (以下「P M S F」という)) で懸濁して、氷上で 1 0 分間保温した。この懸濁液を室温、1 5 0 0 r p m で 5 分間遠心し、上清を除いてから、沈殿に 1 0 0 μ l の C 緩衝液 (2 0 m M H E P E S - 水酸化カリウム (p H 7 . 9)、2 5 % グリセロール、4 2 0 m M 塩化ナトリウム、1 . 5 m M 塩化マグネ

シウム、0.2 mM EDTA、0.5 mM ジチオスレイトール、0.2 mM PMSF)を加えて懸濁後、氷上で20分間保温した。この懸濁液を4℃、15000 rpmで5分間遠心し、上清を回収して核蛋白質抽出物とした。

3) ゲルシフトアッセイ

DNA末端標識キット(メガラベル、宝酒造(株)社製)を用いて各プローブDNA 3.5 pmolを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP(アマシャム・ファルマシア社製)で末端標識した。未反応の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを除去するため、末端標識反応終了後の試料を標識プローブ精製用カラム(ニックカラム、アマシャム・ファルマシア社製)に入れ、400 μ lのTE(10 mM トリシュー塩酸(pH 8.0)、1 mM EDTA(pH 8.0))でカラムを1回洗浄し、次の400 μ lのTEで溶出した画分を回収して、プローブDNA溶液とした。このプローブDNA溶液 2 μ lと10 μ g相当の核蛋白質抽出物(蛋白質濃度はOD₂₈₀値より算出した)および反応液の1/5量のゲルシフトアッセイ用5×緩衝液(プロメガ社製)とを混合して、24℃で1時間保温した。このものを試料としてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった(5%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド重量比19:1)、0.5×TEB(0.045 M トリシュー硼酸、0.045 M 硼酸、0.001 M EDTA)中、100 V定電圧、室温で1.5時間)。電気泳動後のゲルについて、常法に従ってオートラジオグラフィーを行なった。

その結果、ロイストロダクシンB添加によりプローブへの結合能が上昇する転写因子は、調べたものの中ではNF- κ Bのみであることが明らかとなった(図4)。

参考例4. 各種阻害剤による検討

1) SMaseの関与

炎症性のサイトカインであるIL-1 β 、TNF- α は、スフィンゴミエリナーゼ(SMase)からセラミドの生成を促進してNF- κ Bを活性化すると報告されている(Ballou, L. R. et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta. 1301,

273-287)。これまでSMaseには細胞膜に局在するN-SMaseとリソソームに局在するA-SMaseがあることが知られている。そこで、下記の方法に従ってロイストロダクシンBによるNF- κ Bの活性化とSMaseとの関連を、A-SMaseの阻害剤として知られるデシプラミン (desipramine) またはマレイン酸パーヘキシリン (perhexiline maleate) (Albouz, S. et al. (1981) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317, 173-177, Andrieu, N. et al. (1994) Biochem. J. 303, 341-345 および Hurwitz, R. et al. (1994) Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 375, 447-450 参照) を用いて調べた。

mAP-1 DNAを参考例2記載の方法でKM-102細胞に導入後、2 mlの培地で各ウェルを2回洗い、新しい培地に置き換えた。3時間培養後、終濃度1または10 μ Mになるようにデシプラミン (シグマ社製。メタノールで溶解) もしくは終濃度1 μ M、2.5 μ Mまたは5 μ Mになるようにマレイン酸パーヘキシリン (シグマ社製。メタノールで溶解) を添加し、さらに3時間培養後、終濃度50 ng/mlのロイストロダクシンB、終濃度10 ng/mlのヒトIL-1 β (ジェンザイム社製) または終濃度10 ng/mlのヒトTNF- α (ジェンザイム社製) を添加した。16時間後に細胞を溶解し、参考例2に記載した方法に従ってルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、これらの阻害剤は濃度依存的にロイストロダクシンBによるルシフェラーゼ活性増大のみを抑制し、IL-1 β とTNF- α によるルシフェラーゼ活性増大を抑制しないことが明らかになった (図5および図6)。

2) ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼCの関与

A-SMaseの活性化にホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼC (以下「PC-PLC」という) の関与が示唆されている (Schutze, R. et al. (1992) Cell 71, 765-776)。そこでPC-PLC阻害剤として知られるD609 (Schutze, R. et al. (1992) Cell 71, 765-776) を用いてロイストロダクシンBのシグナル経路を検討した。すなわち、参考例2記載の方法でmAP-1 DNAをKM-102細胞に導入後、2 mlの培地で各ウェルを2回洗い、新し

い培地に置き換えた。3時間培養後、終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、滅菌水で調製したD609（モレキュラープロブ社製）を添加し、さらに3時間培養後、終濃度 $50 \text{ng}/\text{ml}$ でロイストロダクシンBを添加した。16時間後に細胞を溶解し、参考例2記載の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、D609は濃度依存的にロイストロダクシンBによるルシフェラーゼ活性増大を抑制することが明らかになった（図7）。同様の実験をロイストロダクシンBの代わりにIL-1 β （終濃度 $10 \text{ng}/\text{ml}$ ）またはTNF- α （終濃度 $10 \text{ng}/\text{ml}$ ）を用いて実施した結果、D609（ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）は、TNF- α によるルシフェラーゼ活性増大を78%抑制したものの、IL-1 β によるルシフェラーゼ活性増大は32%しか抑制しなかった（図8）。

3) IL-8のELISAによる検討

ロイストロダクシンBはKM-102細胞にIL-8の産生を誘導するが、それに対するデシプラミン、マレイン酸パーヘキシリンおよびD609の効果をELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法にて検討した。

すなわち、KM-102細胞をセミコンフルエントになるまで培養した後、トリプシン-EDTA処理により細胞を回収した。この細胞を6穴の細胞培養用プレートへ 2×10^5 細胞/ウェルで加え、一晚培養した。培地交換してから、終濃度 $10 \mu\text{M}$ のデシプラミン、終濃度 $5 \mu\text{M}$ のマレイン酸パーヘキシリンまたは終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のD609を添加してさらに3時間培養してから、終濃度 $50 \text{ng}/\text{ml}$ でロイストロダクシンBを添加した。ロイストロダクシンBを添加してから、8時間、12時間および24時間後に培養上清を回収しELISAキット（バイオトラック ヒトIL-8 ELISAシステム。アマシャム・ファルマシア社製）を用いてIL-8量を測定した。その結果、下記の表1に示すように、デシプラミン、マレイン酸パーヘキシリンおよびD609はいずれもロイストロダクシンBによるIL-8の産生誘導を抑制することが示された。

【表 1】

添加物	I L - 8 産生量 (p g / m l)		
	8 時間	1 2 時間	2 4 時間
なし	< 3 1 . 2	< 3 1 . 2	< 3 1 . 2
ロイストロダクシン B のみ	2 7 0	1 7 5 0	> 2 0 0 0
ロイストロダクシン B と デシプラミン	< 3 1 . 2	5 4	8 4 0
ロイストロダクシン B と マレイン酸パーヘキシリン	< 3 1 . 2	< 3 1 . 2	1 1 0
ロイストロダクシン B と D 6 0 9	測定せず	測定せず	8 8

以上、ロイストロダクシン B の活性は、NF - κ B の阻害剤である NAC、A - S M a s e の阻害剤であるデシプラミンとマレイン酸パーヘキシリン、および PC - P L C の阻害剤として知られる D 6 0 9 で阻害されることから、KM - 1 0 2 細胞においてロイストロダクシン B は A - S M a s e の経路を介して NF - κ B を活性化することが示唆された。また、ゲルシフトアッセイの結果からこの活性化は NF - κ B に対して特異的であると考えられる。

一方、KM - 1 0 2 細胞において、炎症性のサイトカインである IL - 1 β 、TNF - α 刺激による反応は、PC - P L C の阻害剤として知られる D 6 0 9 で一部阻害されたものの、A - S M a s e の阻害剤であるデシプラミンとマレイン酸パーヘキシリンでは阻害されなかった。PC - P L C によって生じたジグリセリドは A - S M a s e の活性化に関与するのみならず、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することが知られている (Heller, R. A. and Kronke, M. (1994) J. Cell. Biol. 126, 5-9) ことから、両サイトカインが KM - 1 0 2 細胞においてスフィンゴミエリンの関与する A - S M a s e 以外の経路、例えば PKC の関与する経路や、N - S M a s e を介した経路などで m A P - 1 の転写活性を増強していると考えられる。

いずれにせよ、KM-102細胞において、ロイストロダクシンBによるNF- κ B活性化のシグナル伝達経路は、炎症性のサイトカインであるIL-1 β 、TNF- α によるNF- κ B活性化のシグナル伝達経路とは異なると考えられた。

実施例 1. スクリーニング系の構築

KM-102細胞を37℃、5% CO₂下にてセミコンフルエントになるまで培養した後、トリプシン-EDTA処理を行なって細胞を回収した。この細胞を細胞培養用シャーレ（ ϕ 100mm、コーニング社製）に 5×10^5 個入れ、一晚培養した。培地を交換してからトランスフェクション用試薬キット（セルフェクト・キット）を用いてトランスフェクションを実施した。すなわち、mAP-1を含むプラスミドDNA 5 μ gと塩化セシウム法で精製したプラスミドpMC1-neo-polyA（ストラタジーン社製）1 μ gを混合後、エタノール沈殿し、滅菌水120 μ lに溶解した。セルフェクト・キット添付のA緩衝液を120 μ l添加し室温で10分間放置した。さらにセルフェクト・キット添付のB緩衝液を240 μ l添加し室温で15分間放置した後、全量を添加して16時間培養した。培養後、5mlの培地でシャーレを2回洗ってから、新しい培地を加えた。5時間培養後、細胞をトリプシン-EDTA処理によりシャーレから回収し、その1/25量を3枚の直径10cmの細胞培養用シャーレにまき直した。各シャーレに抗生物質ジェネティシン（ライフテクノロジー社製）をそれぞれ終濃度1.5mg/ml、1.6mg/mlまたは1.7mg/mlとなるように添加し、7日間培養した。各シャーレから細胞をトリプシン-EDTA処理により回収し、その1/10量をそれぞれ1枚の直径10cmの細胞培養用シャーレにまき直し、元と同濃度のジェネティシンを含む培地で培養した。7日間培養した後、すべてのシャーレについて、ジェネティシンの添加量を終濃度1.5mg/mlとして、さらに5日間培養後、生じたコロニー11個をトリプシン-EDTA処理によりシャーレから回収した。さらに3日後、生じたコロニー8個をトリプシン-EDTA処理によりシャーレから回収した。こうして計19個のジェネティシン耐性KM-102細胞株を得た。

次にこれらのクローンがmAP-1を安定して保持していることを確認するために、19個のクローンを5% FBSおよび1.5 mg/ml ジェネティシンを含有するIMDMで、37℃、5% CO₂下にて培養を行いセミコンフルエントになるまで増殖させた後、トリプシン-EDTA処理により細胞を回収した。この細胞を6穴の細胞培養用プレート（ファルコン社製）へ2×10⁵細胞/ウェルで加え、一晚培養した。培養後、5% FBSを含むIMDMに置き換えた。16時間培養後、終濃度10 ng/mlでヒトTNF-αを添加してさらに16時間培養した。その後、細胞を溶解し、参考例2に示した方法に従いルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、反応性の高い2クローン（#4および#18）を得た。これら2クローンはロイストロダクシンBに対しても反応性を示した。よりTNF-αに対する反応性の高い株を得るため、クローン#4を限界希釈法により再度クローニングを試み、安定してTNF-α、およびロイストロダクシンBに対して反応性を示すクローン（#4-6）を選択した。

得られたクローン#4-6を用いたスクリーニングは以下のように行う。すなわち、#4-6株を5% FBSと1.5 mg/ml ジェネティシンを含有するIMDMで、37℃、5% CO₂下にて培養を行いセミコンフルエントになるまで増殖させた後、トリプシン-EDTA処理により細胞を回収する。この細胞を5% FBSを含有するIMDMで懸濁後、96穴の細胞培養用プレート（ボトムクリアーホワイトプレート、コースター社製）へ1×10⁴細胞/ウェルで加え、一晚培養する。その後、低分子化合物、あるいは微生物生産物を添加し、3時間後にヒトTNF-αを終濃度1 ng/mlで添加する。16時間培養後、各ウェルに100 μlの1 mM 塩化マグネシウム/1 mM 塩化カルシウムと100 μlの発光基質（ピッカジーンLT2.0、東洋インキ製造（株）社製）を添加し、プレートミキサーで30分攪拌する。プレートの底に白色のシールをはり、発光量を発光プレートリーダーで1ウェルあたり5秒間測定する。TNF-αの刺激により上昇するルシフェラーゼ活性を阻害する物質を一次スクリーニングの有効サンプルとする。二次スクリーニングとしてはTNF-αの代わりにロイストロダクシンBを用いて同様の操作を行い、一次スクリーニングの有効サンプルの中で、ロイストロダクシンBの刺激により上昇するルシフェラーゼ

活性を抑制しないものを、最終的に有効なサンプルとして選択することにより、抗炎症剤として有用な物質を同定する。

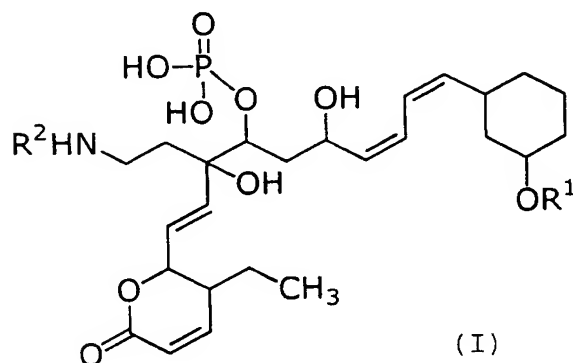
また、同様の実験系で、まずロイストロダクシンBの刺激により上昇するルシフェラーゼ活性を抑制するものを選択し、次に選択されたものの中からTNF- α の刺激により上昇するルシフェラーゼ活性を抑制しない物質を選択することにより、抗動脈硬化剤として有用な化合物を得るための出発物質を同定する。

[産業上の利用の可能性]

以上述べたごとく、本発明により、A-SMaseを介したNF- κ B活性化経路またはA-SMaseを介さないNF- κ B活性化経路のいずれかを特異的に阻害する物質の探索方法が提供された。本発明の方法により、抗炎症剤として有用な物質、または抗動脈硬化剤として有用な化合物を作るための出発物質を得ることができる。

請求の範囲

1. NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子を活性化する細胞内経路のうち、細胞をインターロイキン1 β または腫瘍壊死因子 α で刺激した場合に活性化される経路または同じく下記一般式(I)で表される化合物:



(式中、 R^1 は5-メチルヘキサノイル基、6-メチルオクタノイル基、7-メチルオクタノイル基または水素原子を表し、 R^2 は水素原子または $CO R^3$ で表される基を表し、 R^3 は水素原子または下記B群から選択される置換基を有していてもよいA群から選択される基を表す。ただし、 R^1 または R^2 の少なくとも一つは水素原子である：

〔A群〕 アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アリールアルキル基、アリールアルケニル基、アリールアルキニル基、アルキルオキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、アリールアルケニルオキシ基、アリールアルキニルオキシ基、アルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、アリールアルキルアミノ基；

〔B群〕 ハロゲン基、ヒドロキシ基、低級アルコキシ基、低級脂肪族アシルオキシ基、カルバモイル基、カルバモイルオキシ基、低級脂肪族アシル基、ニトロ基、低級脂肪族アシルアミノ基、低級アルコキシカルボニル基、シアノ基、アリールオキシ基) またはその塩で刺激した場合に活性化される経路のいずれか一つのみを特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法であつて、

(i) 予めNF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にあり、該

プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子（以下「マーカー遺伝子」という）で形質転換された培養細胞を、インターロイキン 1β または腫瘍壊死因子 α の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作；および、

（i i）上記（i）記載の培養細胞を上記一般式（I）で表される化合物またはその塩の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作

を行なつて、（i）または（i i）のいずれか一つの検出操作においてのみマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択することを特徴とする方法。

2. 請求の範囲第1項記載の方法であつて、一般式（I）において R^1 が6-メチルオクタノイル基であり、 R^2 が水素原子であることを特徴とする方法。

3. 請求の範囲第1項または第2項記載の方法であつて、（i）においてマーカー遺伝子の発現を抑制し、（i i）においてマーカー遺伝子の発現を抑制しない被検物質を選択することを特徴とする方法。

4. 請求の範囲第1項または第2項記載の方法であつて、（i）においてマーカー遺伝子の発現を抑制せず、（i i）においてマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択することを特徴とする方法。

5. NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子が配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなることを特徴とする、請求の範囲第1項乃至第4項のいずれか一つに記載の方法。

6. マーカー遺伝子がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、分泌型アルカリホスファターゼおよび緑色蛍光タンパク質からなる群より選択される蛋白質をコードするものであることを特徴とする、請求の範囲第1項乃至第5項のいずれか一つに記載の方法。

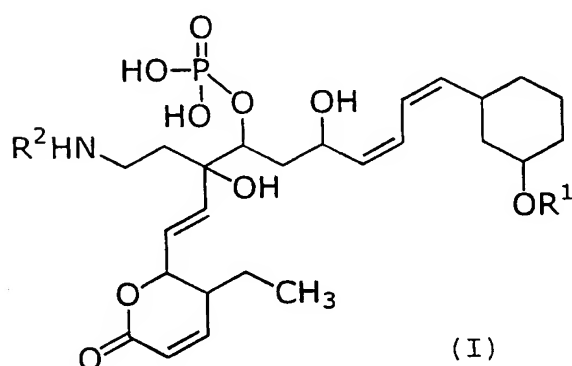
7. マーカー遺伝子がホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする、請求の範囲第6項記載の方法。

8. NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にあるマーカー遺伝子で形質転換される培養細胞が、HL-60、EL4およびKM-102からなる群より選択される細胞株であることを特徴とする、請求の範囲第1項乃至第7項

のいずれか一つに記載の方法。

9. NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にあるマーカー遺伝子で形質転換される培養細胞が、KM-102細胞株であることを特徴とする、請求の範囲第8項記載の方法。

10. NF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子を活性化する細胞内経路のうち、細胞をインターロイキン1 β または腫瘍壊死因子 α で刺激した場合に活性化される経路または同じく下記一般式(I)で表される化合物:



(式中、R¹は5-メチルヘキサノイル基、6-メチルオクタノイル基、7-メチルオクタノイル基または水素原子を表し、R²は水素原子またはCOR³で表される基を表し、R³は水素原子または下記B群から選択される置換基を有していてもよいA群から選択される基を表す。ただし、R¹またはR²の少なくとも一つは水素原子である；

〔A群〕 アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アリールアルキル基、アリールアルケニル基、アリールアルキニル基、アルキルオキシ基、アルケニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、アリールアルケニルオキシ基、アリールアルキニルオキシ基、アルキルアミノ基、アルケニルアミノ基、アルキニルアミノ基、アリールアミノ基、アリールアルキルアミノ基；

〔B群〕 ハロゲン基、ヒドロキシ基、低級アルコキシ基、低級脂肪族アシルオキシ基、カルバモイル基、カルバモイルオキシ基、低級脂肪族アシル基、ニトロ基、低級脂肪族アシルアミノ基、低級アルコキシカルボニル基、シアノ基、アリ

ールオキシ基) またはその塩で刺激した場合に活性化される経路のいずれか一つのみを特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法であって、

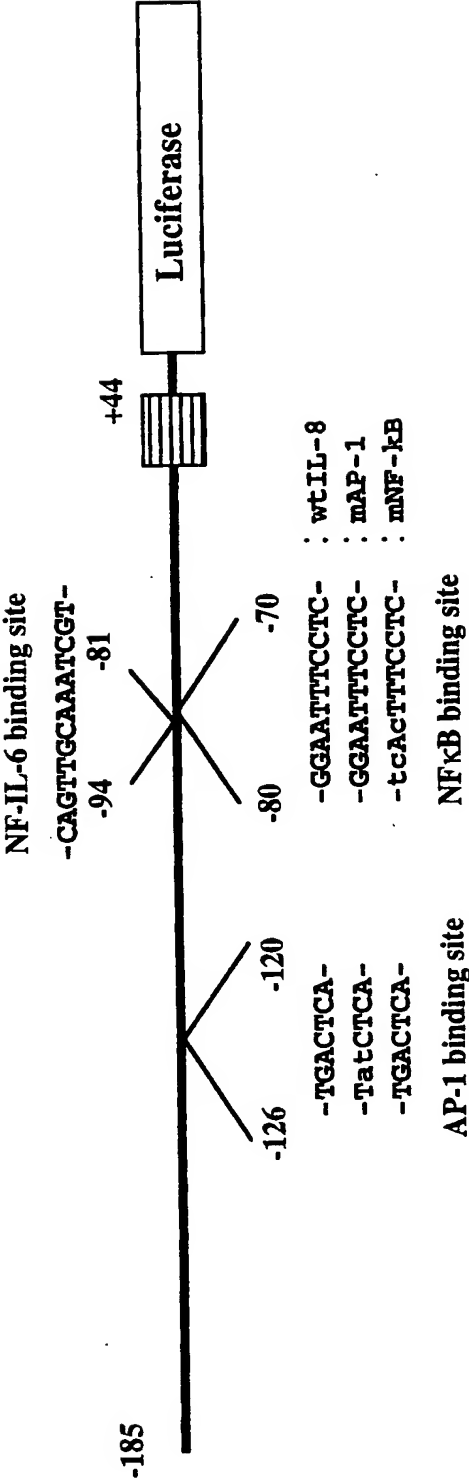
(i) 予めNF- κ B結合部位を含むプロモーター遺伝子の支配下にある、該プロモーター活性の検出を可能ならしめる遺伝子(以下「マーカー遺伝子」という)で形質転換された培養細胞を、インターロイキン1 β または腫瘍壊死因子 α の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作; および、

(ii) 上記(i)記載の培養細胞を上記一般式(I)で表される化合物またはその塩の存在下、被検物質を添加してまたは添加しないで培養し、マーカー遺伝子の発現の有無を検出する操作

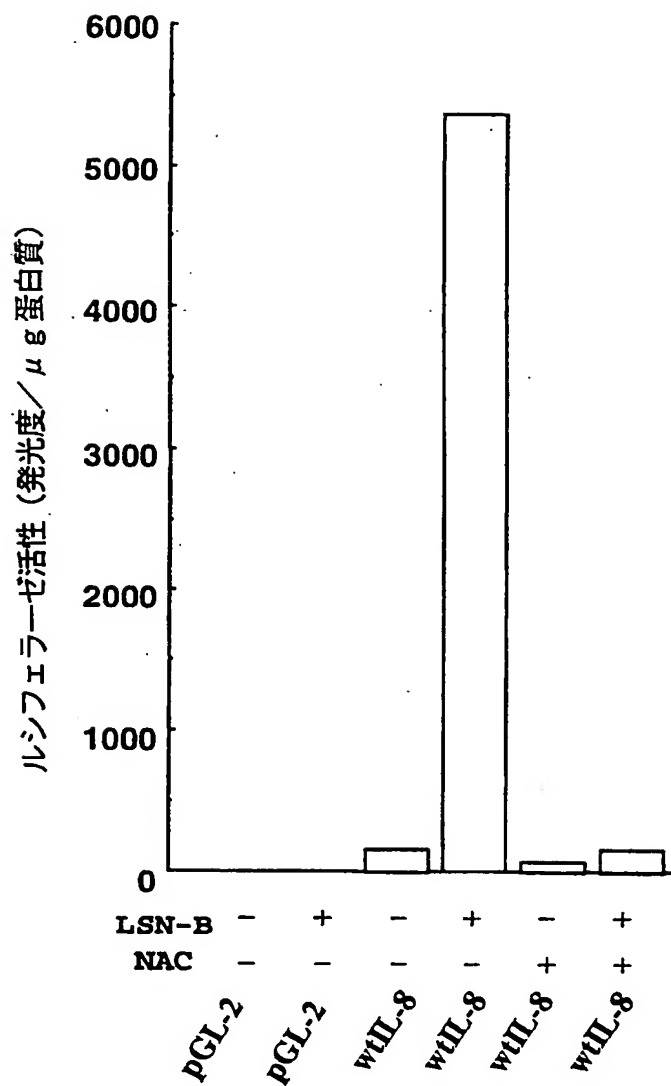
を行なって、(i)または(ii)のいずれか一つの検出操作においてのみマーカー遺伝子の発現を抑制する被検物質を選択することを特徴とする方法のための、上記一般式(I)で表される化合物の使用。

図 面

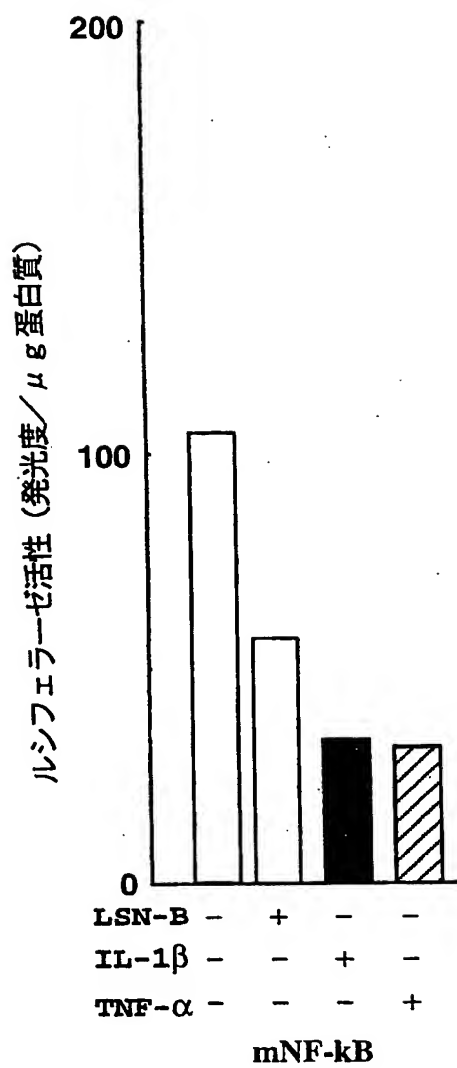
[図 1]



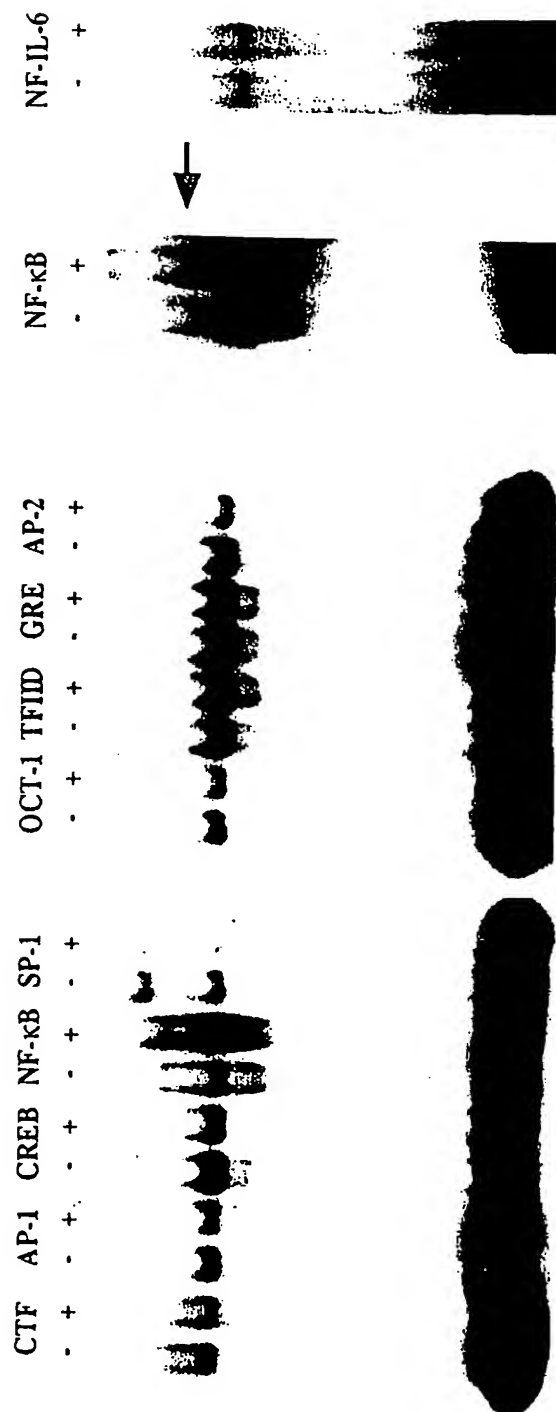
[図 2]



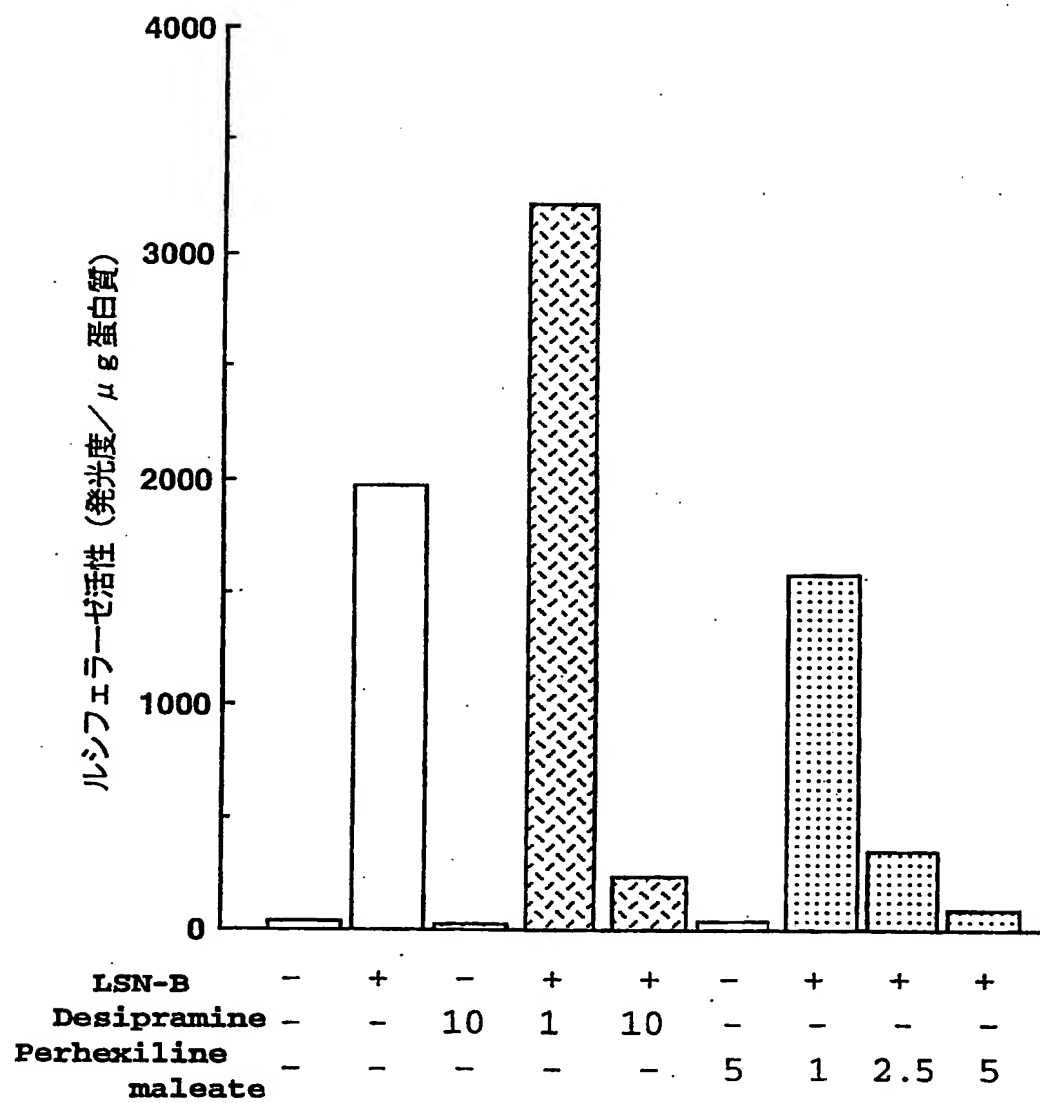
[図 3]



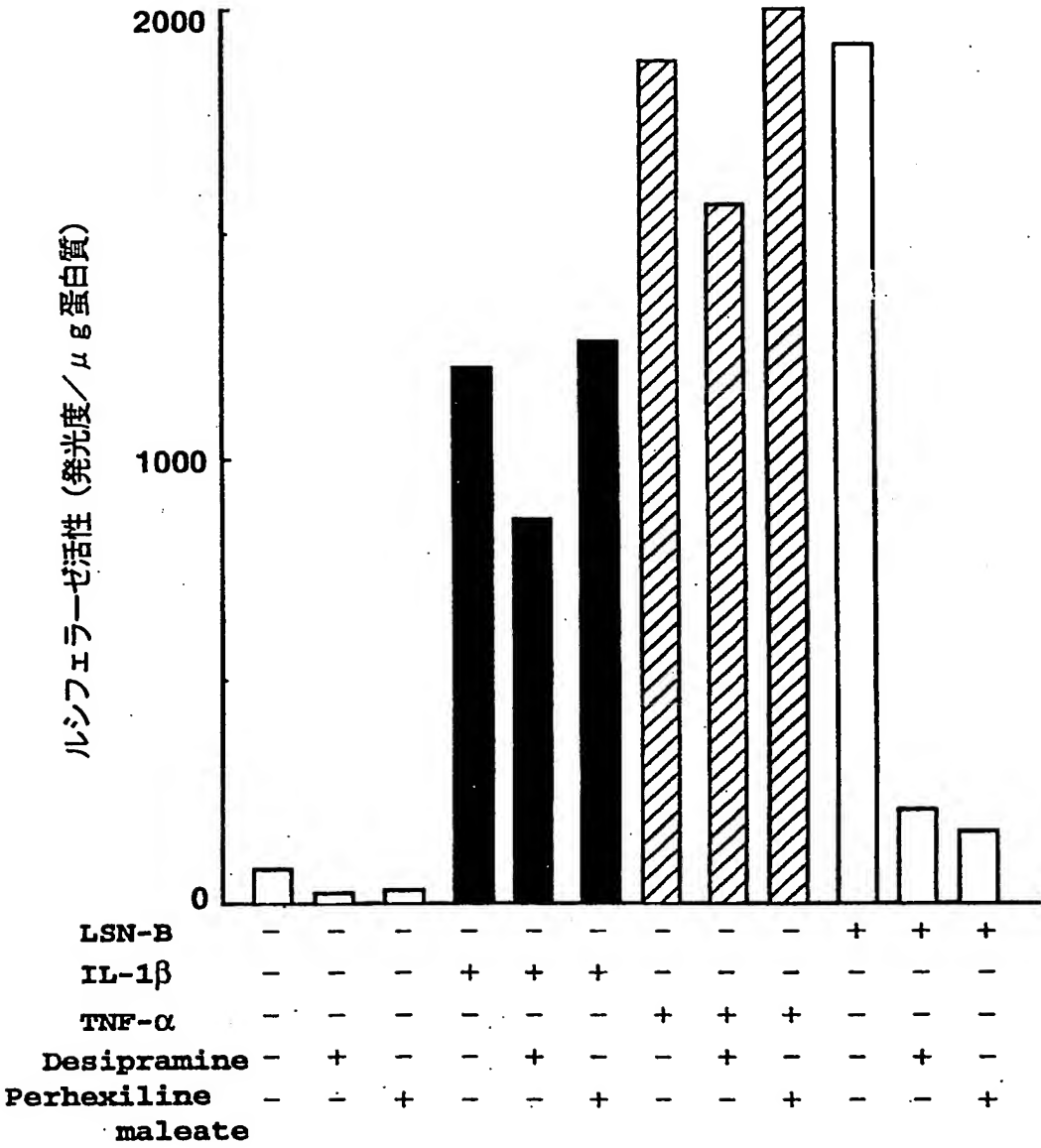
[図 4]



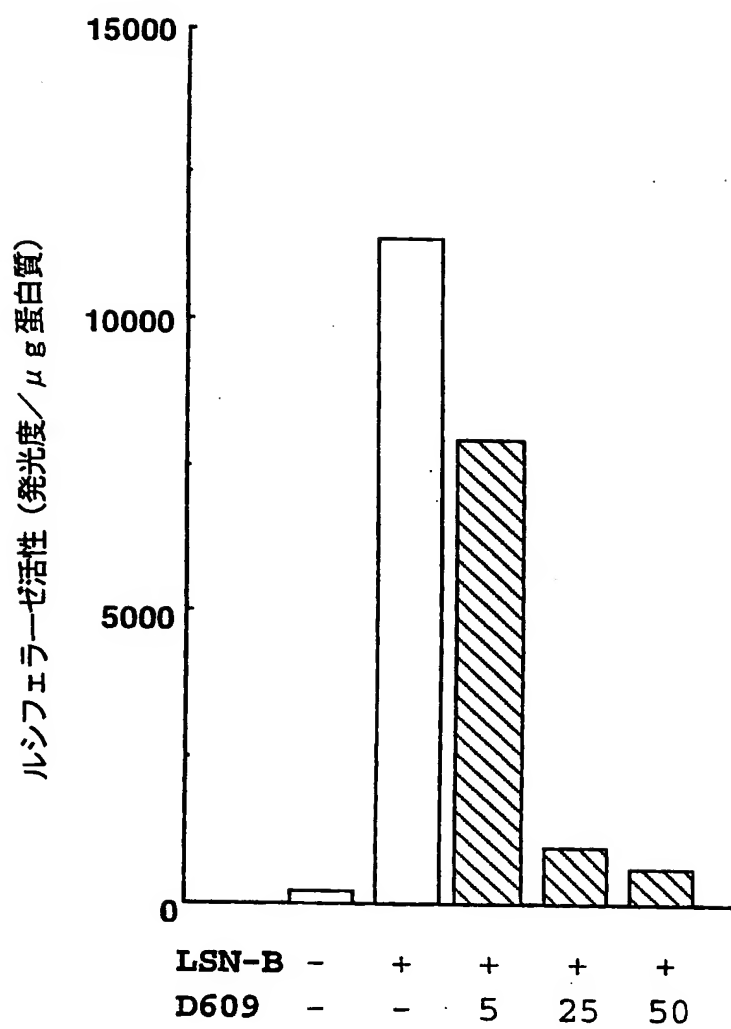
[図 5]



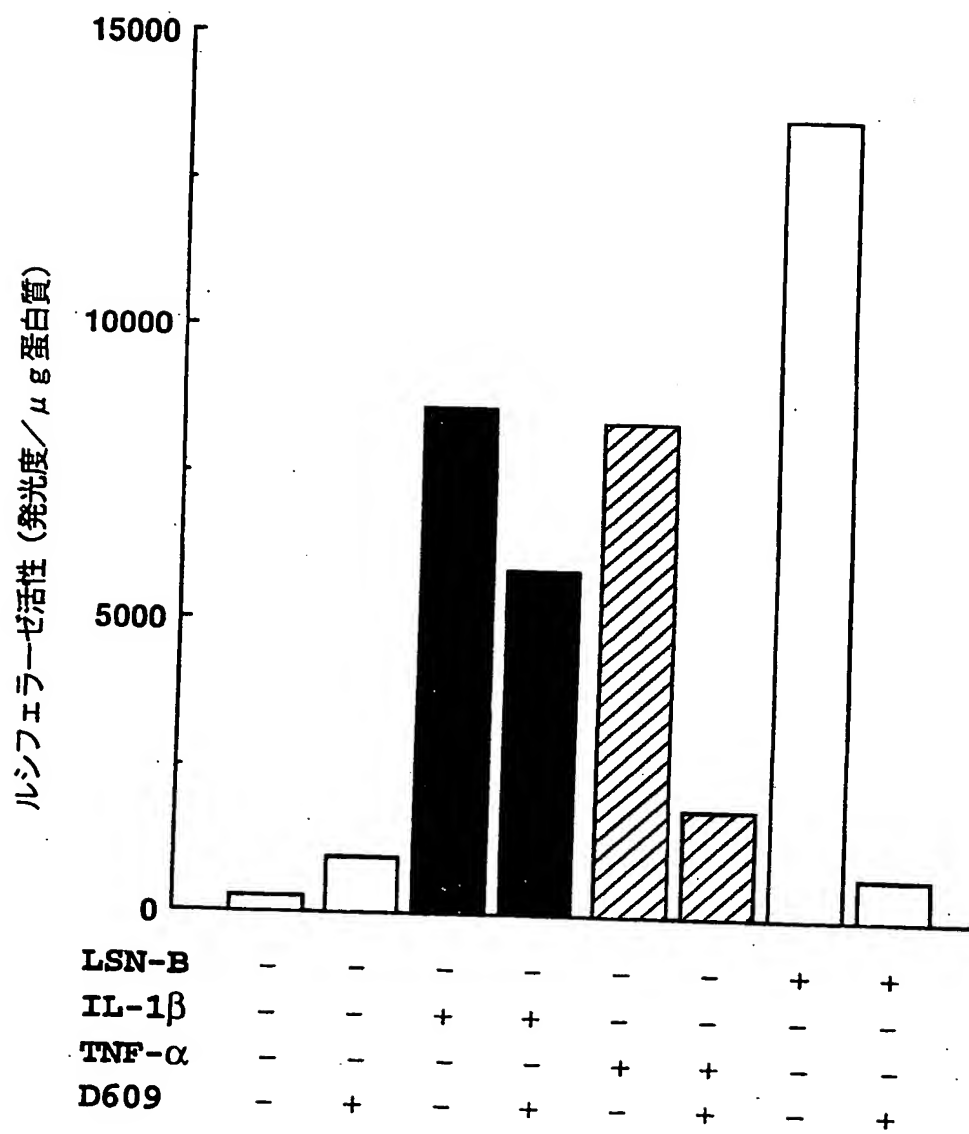
[図 6]



[図 7]



[図 8]



配列表
SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Method for Screening of Biologically-Active Substances

<130> FP-200037

<140>

<141>

<150> JP H11-143032

<151> 1999-05-24

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-regulatory
sequence of human interleukin-8 gene which has a
point-mutation at AP-1 binding site

<400> 1

aaagatcaaa gaaaactttc gtcatactcc gtatttgata aggaacaaat aggaagtgtg 60
atatctcagg ttgcccctga ggggatgggc catcagttgc aaatcgtgga atttcctctg 120
acataatgaa aagatgaggg tgcataagtt ctctagtagg gtgatgatat aaaaagccac 180
cggagcactc cataaggcac aaactttcag agacagcaga gcacacaagc t 231

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer to
amplify 5' regulatory sequence of human
interleukin-8 gene

<400> 2

atgtctcgag aattcagtaa cccaggcatt attttatc

38

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer to
amplify 5' regulatory sequence of human
interleukin-8 gene

<400> 3

ttgtcctaga agcttgtgtg ctctgctgtc

30

<210> 4

<211> 231

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

aaagatcaaa gaaaactttc gtcatactcc gtatttgata aggaacaaat aggaagtgtg 60
atgactcagg ttgacctga ggggatgggc catcagttgc aaatcgtgga atttcctctg 120
acataatgaa aagatgaggg tgcataagtt ctctagtagg gtgatgatat aaaaagccac 180
cggagcactc cataaggcac aaactttcag agacagcaga gcacacaagc t 231

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to introduce a point-mutation at
AP-1 binding site in 5' regulatory sequence
of human interleukin-8 gene

<400> 5

ggaagtgtga tatctcaggt ttgcc

26

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide to introduce a point-mutation at
NF-kB binding site in 5' regulatory sequence
of human interleukin-8 gene

<400> 6

gggccatcag ttgcaaactg ttcactttcc tctgac

36

<210> 7

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-regulatory
sequence of human interleukin-8 gene which has a
point-mutation at NF-kB binding site

<400> 7

aaagatcaaa gaaaactttc gtcatactcc gtatttgata aggaacaaat aggaagtgtg 60
atgactcagg ttgcccctga ggggatgggc catcagttgc aaatcgttca ctttcctctg 120
acataatgaa aagatgaggg tgcataagtt ctctagtagg gtgatgatat aaaaagccac 180

cggagcactc cataaggcac aaactttcag agacagcaga gcacacaagc t 231

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide probe which has NF-IL-6 binding
site

<400> 8

aggaggtcac attgcacaat cttataaagg 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide probe which has NF-IL-6 binding
site

<400> 9

ccttattaag attgtgcaat gtgacgtcct 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/03326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/66, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI/MEDLINE (STN)
CAS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEBS Letters 440, 1998 Marietta Kaszkin et al., "Negative regulation of interleukin-1 β -activated neutral sphingomyelinase by protein kinase C in rat mesangial cells", pp.163-166	1-10
A	The Journal of Biological Chemistry, 271(24), June 1996 Dieter Adam et al., "A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway", pp.14617-14622	1-10
A	The Journal of Biological Chemistry, 268(27), September 1993 Zhaohui Yang et al., "Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor κ B translocation in intact HL-60 cells", pp.20520-20523	1-10
A	Journal of Interferon and cytokine research, 18, 1998 Ryuta Koishi et al., "The effect of Leustroducsin B on the production of cytokines by human mesenchymal cells", pp.863-869	1-10
A	The Journal of Biological Chemistry, 273(47), November 1998 Soizic Bourteele et al., "Tumor necrosis factor	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 August, 2000 (22.08.00)

Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03326

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells", pp.31245-31251	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/66, G01N33/50, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI/MEDLINE (STN)
CAS/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FEBS Letters 440, 1998 Marietta Kaszkin et al., "Negative regulation of interleukin-1 β -activated neutral sphingomyelinase by protein kinase C in rat mesangial cells", p. 163-166	1-10
A	The Journal of Biological Chemistry, 271(24), June 1996 Dieter Adam et al., "A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway", p. 14617-14622	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	The Journal of Biological Chemistry, 268(27), Sep. 1993 Zhaohui Yang et al., "Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor κ B translocation in intact HL-60 cells", p. 20520-20523	1-10
A	Journal of Interferon and cytokine research, 18, 1998 Ryuta Koishi et al., "The effect of Leustroducsin B on the production of cytokines by human mesenchymal cells", p. 863-869	1-10
A	The Journal of Biological Chemistry, 273(47), Nov. 1998 Soizic Bourteele et al., "Tumor necrosis factor induces ceramide oscillations and negatively controls sphingolipid synthases by caspases in apoptotic Kym-1 cells", p. 31245-31251	1-10

BLANK PAGE

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

BLANK PAGE